

ニカメイガ非休眠幼虫における ^{14}C -glucose と ^{14}C -UDPG の代謝

積 木 久 明 ・ 兼 久 勝 夫

昆虫の炭水化物含量は種の間でもあるいは同種でも生育の時期によって異なることが知られている (Wyatt 1967, Zaluska 1959).

ニカメイガにおいては積木ら (1972, 1973) が越冬休眠時の生理的变化を知る目的で、炭水化物含量の変化に注目し、幼虫が生育するに従って血リンパ中のトレハロース含量と組織中のグリコーゲン含量が増加することをみた。また、越冬中脂肪体のグリコーゲン含量ならびに血リンパ中のグリセロール含量が非常に変化することをみた。釜野・井上 (1955) もニカメイガ休眠幼虫のグリコーゲン含量の変化をみている。

そこでニカメイガ休眠時の炭水化物代謝の変化をさらにくわしく調べる上で、まず非休眠時の代謝を明らかにする必要がある、非休眠終令幼虫における炭水化物の代謝を ^{14}C でラベルしたグルコースとウリジンホスホグルコースを用いて、温度による代謝速度の違い、ならびに各組織でのそれぞれの代謝物のとりこみの違いを調べた。

虫の飼育等本実験遂行に協力された当研究室の白神 孝氏に感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

供 試 虫

倉敷産ニカメイガを恒温長日条件下 (積木ら 1972) で飼育した孵化後 40 日前後の終令幼虫を用いた。

^{14}C -化 合 物

^{14}C 化合物は D-glucose-(U)- ^{14}C (以下 ^{14}C -glucose と略記) と Uridine diphosphoglucose-(U)- ^{14}C (以下 ^{14}C -UDPG と略記) (日本放射性同位元素協会製) で $1\mu\text{l}$ 当り $0.1\mu\text{Ci}$ になるように水あるいはリン酸緩衝液で希釈して用いた。

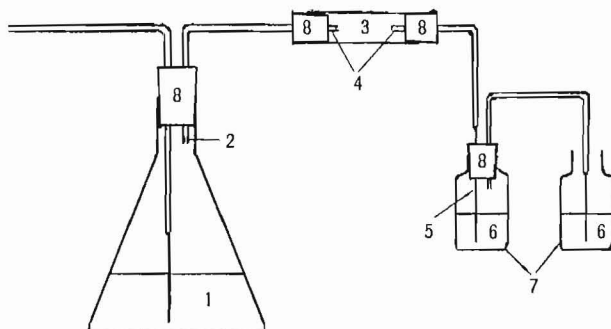
^{14}C -化合物の注射

エーテルで麻酔後、マイクロメーターシリンジで 1 頭当り $1\mu\text{l}$ ずつ腹脚より血リンパ中に注射し、注射部位を糸でしばり血リンパが出ないようにした。1 回に 6 頭ずつ用い 2 回反復した。

炭酸ガス捕集

炭酸ガスの捕集剤としてメチルセルソルブ: エタノールアミン=11:1 (v/v) (Crout ら 1966) 混液 3ml ずつ液シン用バイアルビン (以下バイアルミンと略記) に入れ、次頁

のようにセットしたあと、エアコンプレッサーにて強制的に空気を送り炭酸ガスを捕集した。なお、この方法で第1のバイアルビンで90%以上の炭酸ガスが捕集され、第2のバイアルビンの使用ではほぼ100%が捕集されると推定した。



¹⁴C-化合物の抽出

注射24時間後収容管から取り出した幼虫の体重を測定し、前報(1972, 1973)に従って採血、抽出した。すなわ

ち、採血後リンゲル液中で解剖し各組織に分け、それらを80%エタノール、5%TCAで順次抽出した。抽出残渣は乾燥後エーテルで4回抽出した。

1. 10% NaOH 2. 綿栓 3. 供試虫収容管
4. ガラス管内に供試虫が入りこまないように熱して先端を小さい穴にしておく
5. 先端を細くしたガラス管 6. 炭酸ガス捕集剤
7. 液シン用バイアルビン 8. ゴム栓

¹⁴C-活性の測定

上記80%エタノール抽出液、5%TCA抽出液各1mlをバイアルビンにとり下記の組成のジオキサンシンチレーターを10ml加え、液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC 651:日本無線医理学研究所製)で測定した。5%TCA抽出液は3回等量のエーテルにてTCAを除いたものを¹⁴C-活性の測定に用いた。なお、このエーテル洗液中の放射能はバックグラウンドに等しかった。TCA抽出後の沈澱物のエーテル抽出液は直接バイアルビンにとり、室温で蒸発風乾させた後、下記の組成のトルエンシンチレーターを10ml加えて測定した。エーテル抽出後の残渣はその一部あるいは全部をバイアルビンに移し、ハイアミン10Xを0.5mlあるいは1mlを加え、密封して1晩約50℃の熱風乾燥器中でとかし、15mlのトルエンシンチレーターを加えて測定した。

○ ジオキサン

シンチレーター	
ジオキサン	1 l
ppo	6 g
popop	0.275 g
ナフタリン	112 g

○ トルエン

シンチレーター	
トルエン	1 l
ppo	4 g
popop	0.1 g

ペーパークロマトグラフィー

前報(1972)によりブタノール:ピリジン:水=6:4:3の展開溶媒で展開した。風乾後1~7の部分に分けて切り取り、バイアルビンに入れ、トルエンシンチレーター10mlを加えそのまま測定した。ペーパークロマトグラム上の糖の位置は抽出試料の横に既知の糖を塗布し、展開後切り取って硝酸銀試薬で発色させることにより決定した。

結 果

第1表と第2表は ^{14}C -glucose と ^{14}C -UDPG の注射24時間後に各組織へ取り込まれた ^{14}C ならびに炭酸ガスとして放出された ^{14}C の割合を%で示したものである。4℃のような低温においた時には血リンパ中に最も多く ^{14}C がみられた。しかし、温度が上昇する

第1表 ^{14}C -glucose 注射24時間後の各組織への ^{14}C のとりこみ割合

組 織 \ 温 度	4℃	15℃	25℃
血 リ ン パ	43.4	35.1	16.0
消 化 管	3.4	3.6	2.1
脂 肪 体	4.3	5.9	5.4
そ の 他 組 織	36.6	24.4	27.6
炭 酸 ガ ス	2.4	31.1	49.0

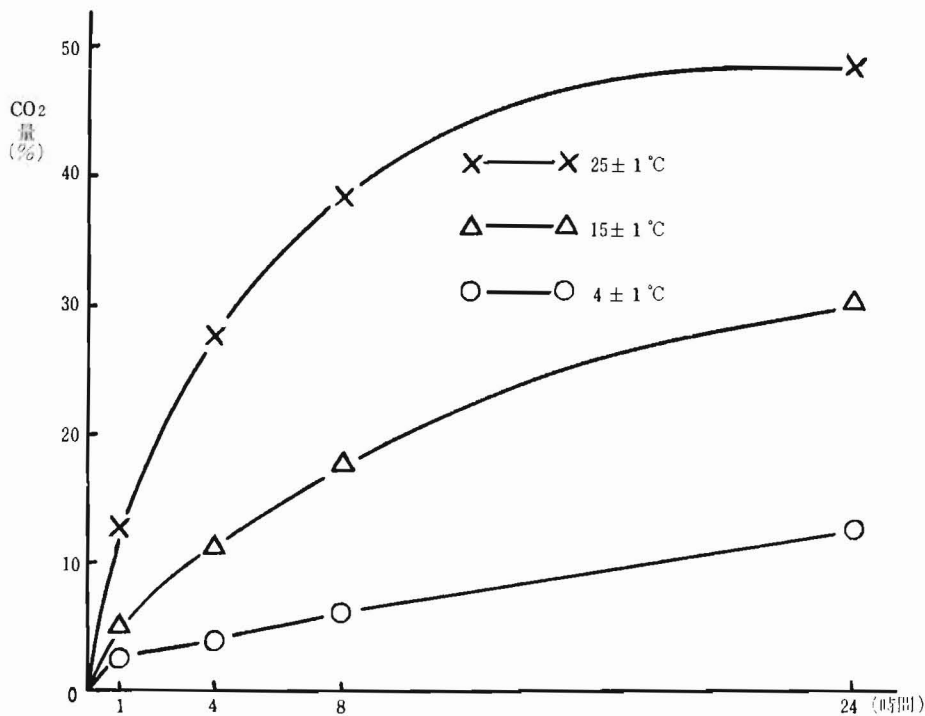
(%)

第2表 ^{14}C -UDPG 注射24時間後の各組織への ^{14}C のとりこみ割合

温 度 \ 組 織	4℃	15℃	25℃
血 リ ン パ	89.4	80.4	58.9
消 化 管	0.5	1.0	2.6
脂 肪 体	1.1	1.9	4.3
そ の 他 組 織	7.8	11.8	11.7
炭 酸 ガ ス	1.2	4.9	22.5

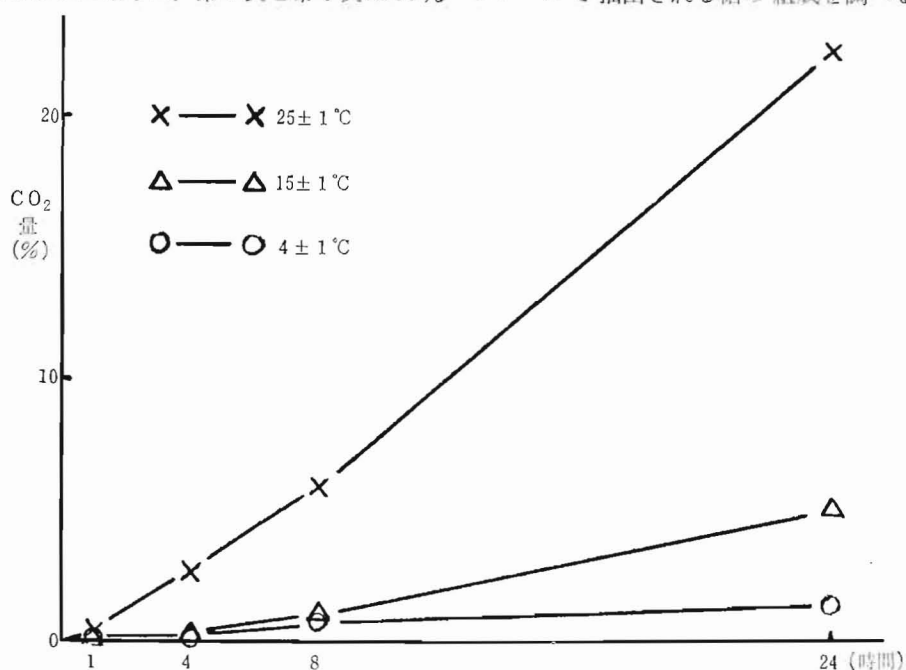
(%)

につれて血リンパ中の ^{14}C が減少し、炭酸ガス中に ^{14}C が多くみられるようになった。しかし、 ^{14}C -CDPG 注射のものでは25℃でも半分以上の ^{14}C が血リンパ中にみられ、炭酸ガスへの移行は少なかった。すなわち、 ^{14}C -glucose 注射に比べ各組織への移行ならびに炭酸ガスへの代謝が非常に遅いことがわかった。第1図と第2図は炭酸ガスとして排出さ



第1図 ^{14}C -glucose 注射24時間以内に CO_2 に代謝された ^{14}C の割合

れた ^{14}C を時間を追って見たものである。 ^{14}C -glucose注射のものでは、各温度とも1時間後にはすでに ^{14}C が炭酸ガスに代謝され排出されているのに対し、 ^{14}C -UDPG注射のものでは1時間後25°Cでわずかに炭酸ガス中に ^{14}C が検出されるのみであった。第3表と第4表は各組織における各抽出分画中に抽出される ^{14}C 量を%で示したものである。 ^{14}C -glucose、 ^{14}C -UDPGとも各組織において低温ほど80%エタノール抽出分画中に ^{14}C が多くみられ、温度が高くなるにつれてTCA、結合物、エーテルの各分画中に ^{14}C が多くみられるようになった。第5表と第6表は80%エタノールで抽出される糖の組成を調べるた



第2図 ^{14}C -UDPG注射24時間以内に CO_2 に代謝された ^{14}C の割合

第3表 ^{14}C -glucose注射24時間後の組織別の各抽出分画中の ^{14}C の割合

温度	抽出分画 組織	80%エタ ノール	5%TCA	エーテル	結合物
4°C	消化管	2.15	0.70	0.01>	0.51
	脂肪体	3.39	0.03	0.03	0.03
	その他組織	18.08	9.44	0.05	8.53
15°C	消化管	1.45	1.15	0.01>	0.96
	脂肪体	2.56	1.62	0.64	1.09
	その他組織	9.44	6.85	0.54	7.52
25°C	消化管	0.99	0.40	0.01>	0.66
	脂肪体	1.74	0.69	2.44	0.57
	その他組織	7.50	7.28	2.76	10.04

(%)

第4表 ^{14}C -UDPG 注射 24 時間後の組織別の各抽出分画中の ^{14}C の割合

温度	抽出分画 組 織	80%エタ ノール	5%TCA	エーテル	結 合 物
4℃	消 化 管	0.31	0.15	00.1>	0.03
	脂 肪 体	0.83	0.17	0.04	0.03
	そ の 他 組 織	4.66	1.37	0.05	1.72
15℃	消 化 管	0.54	0.30	0.02	0.16
	脂 肪 体	1.14	0.25	0.36	0.14
	そ の 他 組 織	6.14	2.27	0.32	3.11
25℃	消 化 管	1.23	0.71	0.01	0.60
	脂 肪 体	1.67	1.17	0.65	0.79
	そ の 他 組 織	6.25	2.38	0.43	2.63

(%)

第5表 ^{14}C -glucose 注射 24 時間後の各組織における 80%エタノール
抽出分画中の糖組成の割合

組 織	血 リ ン パ			消 化 管			脂 肪 体			そ の 他 組 織		
	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃
原 点	40.5	29.9	18.1	50.9	34.4	30.9	21.6	28.4	24.4	62.0	66.4	53.1
未 知 物 質	16.6	23.4	34.4	33.3	37.8	37.8	34.7	37.3	26.1	27.7	22.8	29.1
トレハロース	36.7	42.4	35.6	6.0	14.7	7.7	34.0	21.8	20.5	3.9	3.0	2.8
グルコース	4.3	0.9	8.5	2.9	2.6	4.7	2.0	1.8	1.9	3.7	2.5	3.8
グリセロール	0.6	0.3	0.3	0.5	0.6	0.6	0.2	0.6	0.4	0.7	1.0	0.8

(%)

第6表 ^{14}C -UDPG 注射 24 時間後の各組織における 80%エタノール
抽出分画中の糖組成の割合

組 織	血 リ ン パ			消 化 管			脂 肪 体			そ の 他 組 織		
	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃	4℃	15℃	25℃
原 点	74.4	64.3	66.3	60.2	46.7	33.4	34.0	23.3	16.7	67.0	59.0	43.7
未 知 物 質	6.4	15.9	19.7	26.6	32.8	43.2	12.3	27.1	33.3	21.0	33.1	42.2
トレハロース	14.6	17.4	10.8	5.1	6.3	6.3	33.0	37.2	30.4	5.4	3.1	7.1
グルコース	2.4	1.7	1.6	3.7	6.9	2.3	7.5	6.6	8.0	4.5	3.0	2.6
グリセロール	0.2	0.3	0.3	0.8	0.6	1.0	0.9	1.0	1.0	0.8	0.1	0.5

(%)

めにペーパークロマトグラフィーを用いて分離した結果である。ペーパを7部分に分け全体を100とした時、各々の部分の占める割合を%で示した。各組織とも温度が高くなるほど原点の占める割合が減少し Rf 値の低い未知物質の占める割合が高くなった。脂肪体と血リンパではトレハロースの占める割合が高いのに対し、その他組織では少なかった。

グリセロールへの移行は認められなかった。

考

察

ニカメイガが終令幼虫では周りの温度により糖代謝活性は非常に影響を受けることがわかったが、4℃のような低温においてもこれらの代謝はよく活性を保っていた。

^{14}C -glucose と ^{14}C -UDPG 注射で代謝速度が異なっていた。 ^{14}C -UDPG 注射のものは ^{14}C -glucose 注射に比べ、炭酸ガスへの ^{14}C の移行ならびに組織への移行が非常に少なかった。Treherne (1958 b. c) も locust で ^{14}C -glucose を血リンパ中に注射すると、短時間のうちにトレハロースへ ^{14}C が移行することをみた。Candy and Kilby (1961) により *in vitro* で locust の脂肪体抽出液で UDPG とグルコース 6 リン酸よりトレハロースが合成されることをみた。Murphy and Wyatt (1965) は *in vitro* でセクロピア蚕の幼虫の脂肪体で反応液中にトレハロースが加えられない時には ^{14}C -glucose はトレハロースにとりこまれ、トレハロースが存在する時にはトレハロースとグリコーゲンの両方にとりこまれることをみた。本実験で ^{14}C -glucose が ^{14}C -UDPG よりもトレハロースとグリコーゲンへよくとりこまれたということは、ニカメイガ終令幼虫の比較的初期においては、トレハロースあるいはグリコーゲン合成活性が、グリコーゲン分解活性よりも高いものと推定される。また、この活性は温度によっても変化するものの、4℃のような低温でも非常に活性を保っていることがわかった。

^{14}C -UDPG 注射したものの血リンパ中に非常に多くの ^{14}C が残存しており各組織への転移は少なかった。Myers and Smith (1954) は locust でフェノールと UDPG より glucoside が形成されることをみた。第6表の血リンパの80%エタノール抽出物に β -glucosidase を作用させると未知物質の位置の放射活性が減少し、グルコースの位置の放射活性が増加することから β -glucoside がこの未知物質の一部を占めているものと考えられる。なお、Rf 値より UDPG もこの位置にみられた。

エーテル抽出物中に ^{14}C 活性がみられ、わずかではあるが脂質へも代謝されることがわかった。 ^{14}C -glucose を注射し25℃に置いたものでは脂肪体にとりこまれた ^{14}C の約半分がエーテル抽出分画中にみられた。なお、80%エタノール抽出分画中にも脂質の一部が抽出されることから、さらにこの脂質への移行は多くなるものと推定される。しかし、全体からみた場合脂質への ^{14}C の移行は少なかった。大内(1971)は ^{14}C -glucose をニカメイガに注射して脂質への移行を観察し、全虫体で脂質への移行は少なく、その大部分はトリグリセライドであると報告している。Bade and Wyatt (1962) はセクロピア蚕の4令後期に ^{14}C -glucose を注射して脂質への ^{14}C の移行は少なかったことをみている。

グリセロールへの ^{14}C の移行はほとんどみられず前報(1972)の結果と一致していた。

Zaluska(1959)が炭水化物の貯蔵にキチンが役立っていることを報告して以来、Candy and Kilby (1962), Bade and Wyatt (1962) は locust とセクロピア蚕で ^{14}C -glucose がキチンによくとりこまれ、このキチンが変態時に消化、再吸収されることをみた。Lipke ら(1965b)もゴキブリで ^{14}C -glucose を用いて変態時キチンに ^{14}C が多くとりこまれ、タンパクへの ^{14}C のとりこみは少ないことをみた。本実験でも結合物中に ^{14}C がとりこまれるのがみられた。なお、キチンとタンパクを分離しなかったので ^{14}C のとりこみ

量の違いについてはわからないが、ニカメイガ幼虫の変態に近いところから、キチンへも多くとりこまれているものと推定される。

要 約

ニカメイガ非休眠終令幼虫における ^{14}C -glucose と ^{14}C -UDPG の温度による代謝速度の違い、ならびに各組織での代謝物のとりこみの違いをみた。

^{14}C -glucose も ^{14}C -UDPG も共に温度によって代謝速度が異なり、 4°C 、 15°C 、 25°C において温度が高くなるほど各組織への移行ならびに炭酸ガスとして排出される ^{14}C は多くなったが、 4°C のような低温においてもこれらの代謝活性は高かった。

^{14}C -glucose 注射と ^{14}C -UDPG 注射で代謝が非常に異っていた。 ^{14}C -UDPG を注射したものでは大部分が血リンパ中にみられ、各組織への移行は少なかった。 ^{14}C -glucose を注射したものではよく組織への ^{14}C の移行がみられ、また、炭酸ガスへの代謝も高かった。

これらの糖代謝活性は生育時期によって変化するものと推定される。

引 用 文 献

- Bade, M. L. and Wyatt, G. R. 1962. Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. 1. Deposition and utilization of nutrient reserves. *Biochem. J.* 83: 470—478.
- Cabib, E. and Leloir, L. F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259—275.
- Candy, D. J. and Kilby, B. A. 1961. The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *Biochem. J.* 78: 531—536.
- Candy, D. J. and Kilby, B. A. 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *J. exp. Biol.* 39: 129—140.
- Crout, D. H. G., Denn, M. H., Imazeki, H. and Geissman, T. A. 1966. Pyrrolizidine alkaloids, the biosynthesis of seneciophylic acid. *Phytochem.* 5: 1—12.
- 釜野静也・井上平. 1955. ニカメイチュウ幼虫の休眠期及び休眠覚醒期における水分、グリコーゲン、脂肪の消長について. 農技研報告C第5号 111—116.
- Lipke, H., Graves, B. and Leto, S. 1965 b. Polysaccharide and glycoprotein formation in the cockroach. Incorporation of D-glucose- ^{14}C into bound carbohydrate. *J. Biol. Chem.* 240: 601—608.
- Murphy, T. A. and Wyatt, G. R. 1965. The enzyme of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. *J. Biol. Chem.* 240: 1500—1508.
- Myers, C. M. and Smith, J. N. 1954. Comparative detoxication. 2. Glucoside formation from phenol in locusts. *Biochem. J.* 56: 498—503.
- 大内晴. 1971. 昆虫の脂質に関する研究, 特にニカメイガ幼虫の脂質について. 名古屋大学農学部修士論文.
- Treherne, J. E. 1958 b. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *J. exp. Biol.* 35: 297—306.
- Treherne, J. E. 1958 c. The absorption and metabolism of some sugars in the locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *J. exp. Biol.* 35: 611—625.

- Trivelloni, J. C. 1960. Biosynthesis of glucosides and glycogen in the locust. *Archs. Biochem. Biophys.* 89: 149—150.
- 積木久明・兼久勝夫・白神孝. 1972. 短日と長日条件下飼育におけるニカメイガ *chilo suppressalis* Walker 幼虫時の糖量. *農学研究* 54: 61—70.
- 積木久明・兼久勝夫. 1973. ニカメイガ越冬幼虫時の炭水化物含量と酸素吸収量について. *農学研究* 55: 31—40.
- Wyatt, G. R. 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Advances in Insects Physiol.* 4: 287—360. Acd. Press London.
- Zaluska, H. 1959. Glycogen and chitin metabolism during development of the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Biol. Exp.* 19: 339—351.